

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

⑨ 日本国特許庁 (JP) ⑩ 特許出願公開
⑫ 公開特許公報 (A) 昭64-86974

⑪ Int.Cl.¹
A 61 L 27/00
A 61 K 37/02

識別記号
ADT

序内整理番号
G-6779-4C
8615-4C

⑬ 公開 昭和64年(1989)3月31日

審査請求 有 請求項の数 6 (全6頁)

⑭ 発明の名称 半月組織の治癒用薬剤配合物及びインプラント

⑮ 特願 昭63-150381

⑯ 出願 昭63(1988)6月20日

優先権主張 ⑰ 1987年6月19日⑬米国(US)⑭064215
⑰ 1988年6月8日⑬米国(US)⑭204097

⑱ 発明者 パート・エル・バリー 米国マサチューセッツ州ケンブリッジ、ブラウン・ストリート56

⑲ 発明者 トマス・ヴィー・キン グ 米国マサチューセッツ州ウインチエスター、トウ・ポカホンタス・ドライブ(番地なし)

⑳ 出願人 ブレジデント・アン ド・フェロウズ・オブ・ハーバード・カレッジ

㉑ 代理人 弁理士 倉内 基弘 外1名

明細書

㉒ 発明の名称 半月組織の治癒用薬剤配合物及びインプラント

㉓ 特許請求の範囲

(1) 破損軟骨治癒のための脈管形成因子を含有する薬剤配合物。

(2) 前記脈管形成因子が下記式で表わされるポリペプチド：

<Glu-Asp-Asn-Ser-Arg-Tyr-Thr-His-Phe-Leu-Thr-Gln-His-Tyr-Asp-Ala-Lys-Pro-Gln-Gly-Arg-Asp-Asp-Arg-Tyr-Cys-Glu-Ser-Ile-Met-Arg-Arg-Gly-Leu-Thr-Ser-Pro-Cys-Lys-Asp-Ile-Asn-Thr-Phe-Ile-His-Gly-Asn-Lys-Arg-Ser-Ile-Lys-Ala-Ile-Cys-Glu-Asn-Lys-Asn-Gly-Asn-Pro-His-Arg-Glu-Asn-Leu-Arg-Ile-Ser-Lys-Ser-Ser-Phe-Gln-Val-Thr-Thr-Cys-Lys-Leu-His-Gly>

70 -Gly-Ser-Pro-Trp-Pro-Pro-Cys-Gln-
Tyr-Arg-Ala-Thr-Ala-Gly-Phe-Arg-Asn
105 -Val-Val-Val-Ala-Cys-Glu-Asn-Gly-
Leu-Pro-Val-His-Leu-Asp-Gln-Ser-Ile
120 125 -Phe-Arg-Arg-Pro-OH

或は該ポリペプチドと実質的に同じ脈管形成能を有する該ポリペプチドの軟骨形成部片または誘導体である前記第1項記載の配合物。

(3) 前記脈管形成因子を生理学上許容し得る該因子用キャリヤーに結合付けた形である前記第1項または第2項記載の配合物。

(4) 脈管形成因子を固体ポリマーとアルブミンとのブレンドである固体キャリヤー中に含む損傷後の半月の通常無血管組織の治癒を促進するインプラント。

(5) 前記脈管形成因子が下記式のポリペプチド：

<Glu-Asp-Asn-Ser-Arg-Tyr-Thr-His-Phe-15
-Leu-Thr-Gln-His-Tyr-Asp-Ala-Lys-Pro-Gln-Gly-Arg-Asp-Asp-Arg-Tyr-Cys-30
-Glu-Ser-Ile-Met-Arg-Arg-Gly->

Leu-Thr-Ser-Pro-Cys-Lys-Asp-Ile-Asn
 45
 -Thr-Phe-Ile-His-Gly-Asn-Lys-Arg-
 60
 Ser-Ile-Lys-Ala-Ile-Cys-Glu-Asn-Lys
 -Asn-Gly-Asn-Pro-His-Arg-Glu-Asn-
 75
 Leu-Arg-Ile-Ser-Lys-Ser-Ser-Phe-Gln
 -Val-Thr-Thr-Cys-Lys-Leu-His-Gly-
 90
 Gly-Ser-Pro-Trp-Tyr-Pro-Pro-Cys-Gln
 -Tyr-Arg-Ala-Thr-Ala-Gly-Phe-Arg-
 105
 Asn-Val-Val-Val-Ala-Cys-Glu-Asn-Gly
 -Leu-Pro-Val-His-Leu-Asp-Gln-Ser-
 120
 123
 Ile-Phe-Arg-Arg-Pro-OH

である特許請求の範囲第4項記載のインプラント。

(6) 前記ポリマーがエチレン-ビニルアセテートポリマーである特許請求の範囲第5項記載のインプラント。

3 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は損傷を与えられた通常無血管の組織の治癒を促進する薬剤配合物及びインプラントに関するものである。

62-B卷、397-402頁(1980年)は、切開したウサギの半月を切開を縫合して治癒することを立証し及び血管組織でなく、滑液細胞の侵入が治癒の前駆として始まり、大して血管のない瘢痕となることを示した。アーノフキー(Arnoffsky)等、Am. J. Sports Med., 10(2)卷、90-95頁(1982年)は、血管がヒトのヒザの半月の周辺四分の一においてのみ見出されることを示し及び脈管供給があり難しくて雄性軟骨を裂傷した後の自発的治癒を促進する炎症性応答を支持することができないと結論した。

脈管形成因子は創傷治癒において重要な役割を果すことが知られており(レッチュラ(Rettura)等、FASEBアブストラクト第4309号、61回アニュアルミーティング、シカゴ、(1977年))及び腫瘍細胞及び創傷液から(バンダ(Banda)等 Proc. Natl. Acad. Sci., アメリカ合衆国、79卷、7773-7777頁(1982年)、米国特許4,503,058号)及び網膜細胞から(ドアモール(D'Amore), Proc. Natl. Acad.

し、より創創には脈管形成因子を損傷の近くに適用して治癒を促進するための薬剤配合物及びインプラントに関するものである。

従来の技術

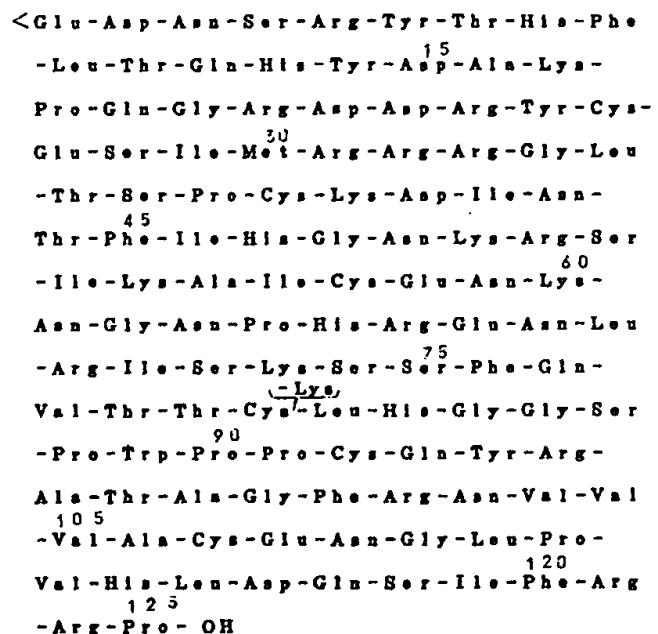
通常無血管の組織、特にヒザ或は手根、転骨の末梢、或は側頭下頸関節の半月(メニスカス)等の雄性軟骨が、裂傷或は断傷部の側発損傷の後に或は故意の外科切開の後に、血野新生された周辺を除いて、耐血管化及び治癒性であることは昔から知られている。キング、J. Bone Joint Surg., 18卷、333-342頁(1936年)は、裂傷させた犬の半月を、裂傷が滑膜と骨面で通じるとすれば、組合組織によつて治癒され得ることを教示した。この教示内容はカボード(Cabard)等、Am. J. Sports Med., 9(3)卷、129-134頁(1981年)によつて確認された。後者は、犬及びモンキーの裂けた半月の治癒が周辺滑膜組織と接触する脈管収縮組織を通して行なわれ及び裂傷の深部に伸びることを示した。ヒートリー(Heatley)、J. Bone Joint Surg..

Sci., アメリカ合衆国、78卷、3068-3072頁(1981年)が紹介された。フォークマン(Folkman)等、J. Exp. Med., 155卷、275-288頁(1971)はウォーカー(Walker)256ラット腹水腫瘍から腫瘍脈管形成因子を単離した。因子は毛管内皮細胞についてミトゲンであり及びRNaseによつて不活性化された。ツアン(Tuan)等、バイオケミストリー、12卷、3159-3165頁(1973年)は、ウォーカー256腫瘍の非ヒストンタンパクにおいてミドゲン及び脈管形成活性を見出した。活性部分はタンパク質と炭水化物との混合物であつた。種々の動物及びヒトの腫瘍が脈管形成因子を産生することが示された(フィリップス及びクマーラ(Kumar), Int. J. Cancer, 23卷、82-88頁(1979年))が、因子の化学的性質は求められなかつた。ウォーカー256腫瘍からの低分子量非タンパク質成分もまた脈管形成性であり及びミドゲン性であることが示された(ワイス(Weiss)等、Br. J. Cancer, 40卷、493-496頁

(1979年)、フエンセロー(Fenselau)等、*J. Biol. Chem.*, 256巻、9605-9611頁(1981年)は分子量400-800ダルトンを有する脈管形成因子を精製して均質にしたが、それ以上特性表示しなかつた。ヒトの肺腫瘍細胞は、高分子量キャリヤー及び低分子量の、おそらく非タンパク質、活性成分から成る脈管形成因子を分泌することが示された(クマー等、*Int. J. Cancer*, 32巻、461-464頁(1983年))。バリー(Vallee)等、*Experientia*, 41巻、1-15頁(1985年)は、ウォーカー256腫瘍からの3つの部分に伴う脈管形成因子を見出した。トルバート(Tolbert)等、米国特許4,229,531号は、ヒト腺癌細胞系HT-29から脈管形成因子を生成することを暗示した。ヘパリン-ビルディンググロースファクター、トランスホーミンググロースファクターアルファ、トランスホーミンググロースファクターベータもまた知られている脈管形成因子である。アンギオゲニンとして知られている脈管形成タンパク質がヒト癌細胞から單

離され及び特性表示され(フェット(Fett)等、*バイオケミストリー*、24巻、5480-5486頁(1985年))、及び本発明において用いるための選択物質である。

すなわち、下記式のペプチド：



及びその脈管形成性断片或は部分或は1~数個のアミノ酸を削除或は置換させ、上に挙げた式のペプチドと実質的に同じ脈管形成活性を維持するそのペプチド誘導体が本発明を実施するために適している。記号>G1aはピログルタミン酸部分を表わすのに用いる。

遺伝子工学分野における当業者ならば、遺伝子工学技術によつて簡便に作ることができる上記のペプチド構造に関連した種々のペプチドを認めるものと思う。それらのペプチドは、リーダーセグメント、例えば満足される(met)開始コドンによつてコードされたセグメント等、を有することができる。こうして、上記の構造に均等な広範囲のペプチドが、慣用の遺伝子工学技術によつて容易に入手し得る。

問題点を解決するための手段

今、有効投与量の脈管形成因子を損傷された組織の近辺に与えることを含む、裂傷、断傷或は切開等の損傷或は断続した後の半月の通常無血管の組織の治癒を促進する薬剤配合物を見出した。最

良の結果を得るためにには、脈管形成因子を、例えば、脈管形成因子及び製葉上容認され得る非毒性キャリヤーを含む組成物の形で、損傷部位の近くに或は直ぐ隣りに、好ましくは損傷された組織に直接接触させて適用或は移植する。キャリヤーは液体であつても或は固体であつてもよく、及び例えばポリマー、例えばメチルセルロース或はエチレンとビニルアセテートとのコポリマー、或は脈管形成因子を長い時間にわたつてゆっくり放出する他のポリマー組成物にすることができる。後者の場合、脈管形成因子は時脈放出インプラントの形である。本発明は上述した半月のような短時間に特別の応用を有する。

有効な用途について要求される投与量は使用する脈管形成因子の強さ及び純度に応じて広範囲にわたつて変わる。純アンギオゲニン(angiotenin)の場合、メチルセルロースのような怠速に放出させるようなキャリヤーで投薬する場合、投与量は治療すべき傷の長さ2~4cm当たり500~900mgの範囲になり得る。特定の場合における有効

な投与量の最適なサイズは日常の試験によつて決めることができる。本薬剤配合物は治癒を通常6~10週内で完治するので、およそ同じ期間、すなわち、6~10週間伸ばして脈管形成因子の供給を与える時間放出インプラントを用いるのがよい。

半月の無血管中央部分における損傷に隣接して移植或は投与する際の脈管形成因子は新脈管形成(neovascularization)、次いで損傷を、結合を使用しないでさえ、治癒することを含む。

右側下方肢全体の毛をそり、70%のアルコール溶液で拭え及び消毒したタオルで包んだ。ひざ開節を、外側パラバテラースキャン及び支帶切開して暴露した。小板の中央を脱臼させ、膝骨頭のオリジンを分割し、ひざを曲げた。10×鏡を用いた双眼解剖用顕微鏡を下で、ミクロスキャンフックを半月の前のホールに入れた。半月を前方に引き及び外側半月の前方三分の一を目視した。小さいメスを用いて半月縁から2mmで出発して半月の本体におよそ0.8mm×2.5mmの水平ポケットを製いた。ポケットを後に半月体の中央三分の一内の頂度粗糲の可視表面下で伸ばした。滑膜への損傷を最小にするよう注意を払つた。

メチルセルロース(4000cps)をオートクレーブに入れ、次いで滅菌水中4℃で一晩操作して溶解した(1%w/v)。アンギオゲニンの凍結乾燥した塩の存在しない資料を1%のメチルセルロース中4℃で2時間速やかに搅拌して懸濁させた。10ミクロリットル容積を消粧な、乾燥したマイラーーの上にのせ、滅菌条件下で接着

下記の特定例は、発明を例示するつもりであつて、発明の範囲を制限するつもりのものではない。

個々のケージに入れた各々が重さ5~7gの9~11匹の雄のニュージーランド白色ウサギに標準の食事を与えたが、手術の前後の両方で、テトラサイクリンを予防として飲み水に加えた。

アセプロマジン(Acepromazine)マレエート(カザス、エルウード、Tech America Group, Inc. : 2-アセチル-10-(3-ジメチルアミノ-ブロビル)フェノチアジンヒドロジエンマレエート)、1.5mg/体重1kg及びケタミン(ニューヨーク、シラキュース、Bristol Laboratories: DL-2-(0-クロロフェニル)-2-(メチルアミノ)シクロヘキサンヒドロクロリド)、2.5mg/体重1kgの筋肉内注射及び1%のキシロカain(マサチューセッツ、ウエストボロー、Astra Pharmaceutical Products, Inc. : アセトアミド、2-(ジエチルアミノ)-N-(2,6-ジメチルフェニル)-モノヒドロクロリド)2ccの局部皮下注射を用いて、ウサギに麻酔した。

したマイラーシートの上にのせ、滅菌条件下で風乾して直径3mmの透明なペレット成形ディスクを形成した。各々はアンギオゲニン100ngを収容した。ペレットを収容するシートを滅菌した正方形ペレット皿に入れ、デシケーター中に入れ、更に60分間凍結乾燥して、ペレットが完全に乾燥するのを確実にした。アンギオゲニンを含有しない対照のメチルセルロースディスクを製造した。ディスクを、滅菌条件下で、個々に帽子でプラスチックシートから取り出し、折りたたみ、各々を別々に20ゲージ針の鋭い端部に差し込んだ。

試料を保持する20ゲージの針の尖端を各ラビットの半月のポケットに挿入し、20ゲージのとげ状(spinal)針からの針を用いて針から円板を外し、試料を正確に取出し及び半月輪断面へ押しこんだ。次いで、1mmの垂直切断(ナイフカット)をポケットの中間に作つて縫の裂傷をシミレートした。

縫を伸ばし、深部骨を剥離し、組織を500mgゲンタミシン/1を含有する0.9%食塩水で洗浄した。該歯支

帶を3-0ビクリル(Vicryl) 吸収性縫合を間欠的に8箇所行つて閉じ、4-0ビクリル皮下連続縫合で皮ふを閉鎖した。ラビットをケージ内に放し、標準の飼を与えた。テトラサイクリンを術前・術後に飲料水に加えた。

ラビットの群を、アセブロマジン・レエート5mg/kg及びケタミン50mg/kgの致死の静脈注射を用いて、3、6、8、9、12及び26週の間隔で殺した。腹腔鏡を解剖面鏡鏡を用いて全体的に検査し、所見を記録した。観察者には移植した資料の識別をブラインドにした。^{新脈管形成にポジティブと評価した}結果を新脈管形成の有無により評価したこれらの試料については、ポケット及び切断の有無(治療・非治療)に関して第2の観察を記録した。

組織学的検査についての試料を10%中性緩衝ホルマリン溶液中に貯蔵した。半月とその下の骨を含む横断切片を脱灰し、ヘマトキシリン及びエオシンで包埋し及び染色させ、光学顕微鏡検査した。

アンギオゲニンを移植した75個の半月のうち、

前角の上に成立し、それがポケット及び切断部へ向つていた。隆起血管は見られず、連結組織はポケットまたは切断部に通していなかつた。しかし、これらの結果は有効例として評価される。

アンギオゲニン群と対照群との統計上の差は有意であつた。

アンギオゲニン群では、新脈管形成は4週間前に殺したものの中27% (8個中3個)に見られ、6~10週のものでは57% (53個中50)に見られ、また10週後のものは43% (14個中6個)に見られた。治療時間の分析を表1に示す。

対照群において、2つの「ポジティブな」応答が6週及び8週に見られた。

59(52%)に新脈管形成が観察された。新脈管形成は前角及び半月の本体に接する骨膜から移植ポケット方向に成長する、隆起血管との結合組織のパンヌス(血管増殖)と特徴付けられる。ポケット口と切断部の界面(「治療」)はこれら59個の新脈管形成半月中、6例で起きた。「治療」はポケットを覆い、且つ口を密ぐに充分な細さの結合組織のパンヌス形成に付随するものと思われる。半月の前角の狭窄は、「瘢痕組織」のある程度の治療拘離が起きていたかの如くこの如い反応に伴うことがしばしばあつた。

新脈管形成のないアンギオゲニン群は、明らかに術後変化がなく、移植日と同じに見え、血管形成はパンヌスが見られなかつた。ポケットと切断部は変わらず、メチルセルロースは見出されなかつた。

対照群では、22個中20(91%)の群は手術日の状態のままで、新脈管形成もなく、ポケットまたは切断部(ナイフカット)の変化もなかつた。2個の群(9%)では結合組織のパンヌスが

表 1

アンギオゲニン移植及び取扱する経過時間

経過時間 (週)	ラビット数	ポジティブの結果数
3	8	3 (27%)
6	14	5 (35%)
8	23	12 (52%)
9	16	13 (81%)
12	8	4 (50%)
26	6	2 (33%)

ヘマトキシリン及びエオシンで染色した組織片は、周囲から半月^{新脈管に侵入する幼い}脛骨骨髄組織により取囲まれた広い範囲を示した。隆起管を有する骨膜組織は半月の表面に付着していた。加えて、新たな軟骨組織であると思われるものによる異常な組織像は侵入組織と正常組織軟骨との界面において確認された。

エチレン・ビニルアセテートコポリマー(60:40)をラビットアルブミンと共にアンギオゲニン用キャリヤーとして用いて同じ結果を得た。

エルバックス(Elvax)珠のラビットアルブミン含有量の最適化

加入したアンギオゲニンを放出するコポリマー対アルブミンの最適な比を求めるために、ラビットアルブミン及びコポリマー(エルバックス4.0P)を種々の量で加入した一連のペレットを作つた。ラビット血清アルブミン50%及び所望の量の(¹²⁵I)標識したアンギオゲニンを水1ml中に溶解し及び0.22ミクロンフィルターに通して通過して玻璃チューブに入れて滅菌した。滅菌溶液を次いで凍結し及び凍結乾燥した。ラビットアルブミンはバルクキャリヤー及びアンギオゲニン放出のエフェクターとして働き、ラビット由来であるのでラビットに移植した後に何ら免疫反応を何ら生じない。凍結乾燥したアルブミン-アンギオゲニン固体を滅菌した状態で混合して均質な粉末とした。粒径の均一性は製剤の有効性にとって重要である。次いで、コポリマーをジクロロメタンに溶解した1.0%溶液1ml(コポリマー1.00%)を、所望の量の粉末を収容するチューブに加え、

0及び1.0重量%を含有するペレットは1日にアンギオゲニンを少ない量で放出し、その後放せなかつた。おそらく、放出された物質はペレットの表面上にあつたものと思われる。アルブミン4.0及び5.0重量%を含有するペレットは1日にアンギオゲニンを大きい量で放出し(それぞれ58%及び77%)、アルブミン5.0%のペレットは中位の放出速度を示したにすぎない。このデータから、コポリマー2重量部及びラビットアルブミン1重量部から成る実用的組成物を用いて1ペレット当りアンギオゲニン1.0ナノグラム~1.0マイクログラムを含有するペレットを作つた。

かかるペレットの有効性は、半月ポケットにおけるインプラントとしてメチルセルロースペレットの代りにコポリマー:アルブミン2:1のペレットから切取したピラミッド形状の片を用いて本質的に上述した外科的手法に従つて試験した。アンギオゲニン全1.00%を含有する1個成は2個の片を鉛子を用いて各々のポケットの中に入れだ。対照はアンギオゲニンを含有しなかつた。代

チューブをシールし、内容物を封管ミキサー上で高温度において10分までの間攪拌して均一な懸濁液とした。この懸濁液を、18ゲージステール針を付けた5mlの使い捨て注射器の中に引き上げた。次いで、懸濁液を、無水(absolute)エタノール2.0mlをドライアイス/エタノール浴中で-78℃に冷却した50mlビーカーに落とすことによる針頭の中に押出した。滴は冷エタノールと接触した際にゲル化して球形状となつてビーカーの底に沈んだ。10分後ビーカーを浴槽から取り出し及び暖めさせて室温にした。ジクロロメタンをゆっくりエタノールに抜き取るにつれてビーズは白色に変わつた。新しいエタノール浴槽中で一晩インキュベートした後にペレットを恒温フード中で風乾した。このようにして作つたペレット(数かよそ5.0)は寸法約1mmであつた。これらのペレットからのアンギオゲニンの放出速度は、ペレットを57℃の生理的食塩水中にインキュベートすることによつて測定し及び(¹²⁵I)アンギオゲニンの時間による放出を測定した。アルブミン

換的には、P-5針に单一の4/0ビクリル或は6/0プロリン結合糸をつけて用いてポケットを開じた。動物を8週で摘除し及び半月の治療及び新膜管形成を検査した。

結果を下記の表2に示す:

ラビットの数	表 2			
	治療した	新膜管形成	効果無し	ポジティブ 効果を示す パーセンテージ
アンギオゲニン	21	21	45	48
対 照	2	0	10	10

アルブミンと他のポリマーとのブレンド成は混合物もまた時限放出インプラントにおけるアンギオゲニン用キャリヤーとして用いてよい。各々の場合において最適な有効性についての割合は簡単な試験によつて求めることができる。

代理人の氏名 井 内 英 弘

同 風 间 弘 志